



TITLE:

非淋菌性尿道炎に於ける
Pleuropneumonia-
LikeOrganisms(PPLO)に関する知見
補遺 第1編:PPLO分離のための
ThalliumAcetate含有選択培地に就
て

AUTHOR(S):

倉岡, 雍男

CITATION:

倉岡, 雍男. 非淋菌性尿道炎に於けるPleuropneumonia-LikeOrganisms(PPLO)に関する知見補遺 第1編:PPLO分離のためのThalliumAcetate含有選択培地に就て. 泌尿器科紀要 1959, 5(10): 1028-1034

ISSUE DATE:

1959-10

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/111842>

RIGHT:

非淋菌性尿道炎に於ける Pleuropneumonia-Like Organisms (PPLO) に関する知見補遺

第 I 編 PPLO 分離のための Thallium Acetate 含有選択培地に就て

大阪通信病院泌尿器科 (主任 山本 弘博士)
大阪大学微生物病研究所真正細菌学部 (部長 藤野 恒三郎教授)
倉 岡 雍 男

Supplementary Studies on Pleuropneumonia-Like Organisms in Non-Gonococcal Urethritis in Males

I : A Selective Medium Containing Thallium Acetate for the Isolation of Pleuropneumonia-Like Organisms (PPLO)

Yasuo KURAOKA

*From the Department of Urology, Osaka Teishin Hospital
(Director : H. Yamamoto, M. D.)*

*From the Department of Bacteriology, Research Institute for
Microbial Diseases, Osaka University, Osaka
(Director : Prof. T. Fujino)*

1) Three strains of PPLO isolated from male non-gonococcal urethritis (NGU) and 7 species of bacteria were examined to determinate the effects of thallium acetate in "PPLO agar (Eiken)" in suppressing their growth.

The results showed that ;

The three strains of PPLO were not inhibited by thallium acetate in a 1 : 500 concentration, but the strains of *Corynebacterium* and *Gaffkya tetragena* were inhibited by a 1 : 2,500 concentration.

Concentrations of 1 : 1,000 of thallium acetate inhibited the growth of *Neisseria gonorrhoeae* and *Serratia marcescens*, while the strains of *Escherichia coli* were inhibited by a 1 : 500 concentration.

Gram positive diplococcus (isolated from NGU) was the only bacteria which appeared to be unaffected by the thallium acetate.

No "L" type colonies were observed on any of the thallium acetate plates inoculated with bacteria.

2) At the Urological Department of the Communications Hospital, Osaka, from 1955 to 1958, a total of 450 patients were studied to evaluate a selective medium containing thallium acetate for the isolation of PPLO from clinical material.

PPLO were isolated from 44 out of 450 cases ; 28 (12.2 per cent) of 230 male cases with NGU, 4 (3.1 per cent) of 131 gonococcal urethritis, 2 (3.5 per cent) of 56 healthy men and 10 (30.3 per cent) of 33 gynecologic patients.

Of a total of 44 strains of PPLO, 36 (82 per cent) grew on a selective medium containing 0.04 per cent of thallium acetate, including 29 strains (80 per cent) that were isolated in pure cultures.

Of 44 strains, 24 were recovered on "PPLO agar (Eiken)" of which 6 (25 per cent) were isolated in pure culture.

On the "Ishihara medium" for gonococci, PPLO were isolated in pure culture in 7 (29 per cent) out of 24 cases with positive cultures.

The selective medium containing thallium acetate was most effective in inhibiting contaminants as compared with "PPLO agar (Eiken)" and "Ishihara medium" for gonococci, and thus has proven very useful for the isolation of PPLO from clinical material.

PPLO の培養においては、栄養価の高い培地と一般細菌にくらべ比較的長い培養時間を必要とする。かような条件下では培養も汚染され易く他細菌の発育は旺盛をきわめ、為にPPLO 集落を看過すること多く、時にその分離を不可能ならしめる。従つて、広範囲に各種細菌の発育を阻止すると同時に PPLO の発育は妨げない選択培地の必要性が要望され、従来、この目的に副う為に種々の細菌発育阻止物質の選択培地への使用が研究されている(Edward¹¹⁾, Smith 等⁶⁾, Morton 等³⁾, White⁹⁾, Mortonおよび Lecce⁴⁾)。

一般に Penicillin 含有選択培地は、ある種の細菌の L 型を形成するので好ましくないといわれる。Potassium tellurite は高圧滅菌に耐えない等の培地作成上に難点⁶⁾があり、Crystal violet は培地の含有蛋白量の多少によつて PPLO の発育を左右³⁾するという。その他 Sulfamethazin を使用した報告⁶⁾もあるが、1953 年 Morton および Lecce⁴⁾ により Thallium acetate の優秀性が確認されて以来、現在 PPLO の選択培地として Thallium acetate が最も広く用いられている。併し、臨床材料からの PPLO 分離につき、本培地の使用を系統的に評価したのは皆無といつてよい

私は先づ PPLO その他数種の細菌株をもつて Thallium acetate の選択作用を実験した。次いで過去 4 年間大阪通信病院泌尿器科の男子尿道炎 361 および健康男子 56 計 417 例、並に少数例の婦人患者の培養に本培地を使用し、臨床材料からの PPLO 分離の為に Thallium acetate 含有選択培地の実用価値を比較検討した。

(本論文の一部は昭和 29 年第 5 回中部連合泌尿器科学会⁷⁾ 及び昭和 30 年第 43 回日本泌尿器科学会総会⁸⁾ に発表した。)

I. 実験材料及び実験方法

A. Thallium acetate (T と略称) の選択作用に関する試験管内実験。

1) 使用菌株。非淋菌性尿道炎 (NGU) からの大阪通信病院保存 PPLO 株 3, Gram 陽性 Diplococcus 2, Corynebacterium 1, Gaffkya tetragena 1 及び Neisseria gonorrhoeae 1 計 8 株に加うるに、大阪大学微生物病研究所保存の Corynebacterium diphtheriae 1, Serratia marcescens 1, 大阪市立大学医学部第 2 外科教室保存株 Escherichia coli 2, 総計 12 株を供試した。

2) 供試 Thallium acetate 含有培地 (T 培地)

PPLO 用基礎培地成分 (ポリペプトン 20.0 g, 葡萄糖 0.5 g, NaCl, Na₂HPO₄ 各々 5.0 g, 寒天末 20.0 g, 蒸留水及び牛心肉水各々 500.0 ml) を混和溶解し、之に予め高圧蒸気滅菌した 10% Thallium aceticum oxydulatum (Merk) を適宜添加する。pH 7.8 に修正後試験管に 8 ml 宛分注、高圧蒸気滅菌し、65°C 前後の温度の時に各分注試験管に家兎脱線維血液を 2 ml 宛添加混和、斜面培地として使用に供する。本実験の目的に夫々 0.04%, 0.1% 及び 0.2% の T 培地が作成された。

3) 菌液の作成及び移植菌量。

(i) PPLO PPLO 用固形培地 (第 I 表) にて 3 日培養後、集落数の均一に発育した部分の約 1 cm² を寒天片と共に切りとり、之を PPLO 用液体培地 (第 I 表) 2.0 ml 入り小試験管内に投入して碎くしばらく静置して寒天片の沈殿を待ち其の上澄を 1 白金耳宛、夫々 T 培地に塗抹移植した。

(ii) Corynebacterium 及び Neisseria gonorrhoeae : 淋菌用石原液体培地⁶⁾ (第 I 表) 5.0 ml 入り試

第 I 表

淋菌用石原液体培地	PPLO 用 培 地	
	液体培地	固形培地
ポリペプトン 20.0 g	……………同 左	……………同 左
葡 萄 糖 0.5 g		
NaCl 5.0 g		
Na ₂ HPO ₄ 5.0 g		
蒸 溜 水 1,000 ml		
	…………… 500 ml	…………… 500 ml
	牛心肉水 500 ml	寒天末 20.0 g
pH 7.3	7.8	7.8
家兎脱線維血液 10%	家兎血清 20%	家兎脱線維血液 20%

試験管に夫々 1 白金耳宛移植し、37°C 18 時間培養後、この千倍稀釈液の 1 白金耳宛を T 培地に塗抹移植した。

(iii) 其他の菌株：淋菌用液体培地の代りに肉水を使用する他は、すべて上述同様の操作によつた。

4) 培養及び判定方法。

37°C、5 日培養により肉眼的に集落発生を認めたのを + とする。而して 5 日後試験管より固形培地を取出し、集落顕微鏡を用いて集落を認めないのを - と判定した。尚 PPLO の確定は、集落の捺印標本を作成し、Dienes 液或は細川氏液⁵⁾にて染色検鏡によつた。

B. 臨床実験。

1955 年 1 月より 1958 年 12 月に至る 4 年間の大阪通信病院外来男子尿道炎 361 例、即ち NGU 230 例及び淋菌性尿道炎 (GU) 131 例を実験の対象とした。別に健康男子 56 例及び婦人患者 33 例を選び対照とした。

1) 実験材料の採取と移植。

何れも尿道分泌物を実験材料とし、先ず患者の亀頭、外尿道口及び舟状窩を酒精綿で厳重清拭後、白金耳を尿道内に挿入、尿道壁をかすり気味に引出して分泌物を採取した。婦人患者では膣及び子宮頸管分泌物を材料とした。之を次の 3 種の固形培地面に夫々塗抹移植する。

2) 使用培地。

G 培地には家兎血液を 10% に加え pH 7.3 とし、E 及び T 培地には家兎血液を 20% に加え pH 7.8 とし、夫々実験材料を塗抹する。T 培地に就いては、最初試験管内実験成績に基き、0.04、0.1 及び 0.2% の 3 種含有培地を作成、基礎的臨床比較実験を試みた処、実際

第 II 表

[i] G 培地 (淋菌用石原培地)	[ii] E 培地 (PPLO 用培地)	[iii] T 培地 (タリウム塩 含有培地)
ポリペプトン 20.0 g	……………同 左	[ii] + 0.04% タリウム 塩
葡 萄 糖 0.5 g		
NaCl 5.0 g		
Na ₂ HPO ₄ 5.0 g		
寒 天 末 15.0 g		
蒸 溜 水 1,000 ml	…………… 20.0 g	…………… 500 ml
	…………… 500 ml	牛心肉水 500 ml
pH 7.3	7.8	7.8
家兎脱線維血液 10%	20%	20%

上、0.04% 濃度で充分普通細菌の發育を抑制すると共に PPLO の發育に支障を来さないことを認めた。よつて本実験は専ら 0.04% T 培地により行われた。

3) 培養方法。

37°C、好氣的培養による。但し最初の 3 日間は、底に湿綿を敷いた密閉硝子筒内に培養基を入れ孵卵器内に納める高湿度法を採用した。

4) 判定方法。

細菌に就ては、先づ 2 乃至 5 日目に肉眼的観察、次いで 7 乃至 10 日目に固形斜面培地を試験管より取り出し集落顕微鏡下に精査し、夫々性状を異にする集落につき染色検鏡、判定を下した。PPLO の判定は、先に協同研究者の一人大島⁵⁾が詳細に記載した如くに行つた。

II 実験成績

A. Thallium acetate の選択作用に関する実験成績。

種々の濃度の T 培地をもつて PPLO 其他各種細菌純培養株の發育に及ぼす T の選択作用を観察し、第 III 表の如き結果を得た。

NGU から分離された PPLO 3 株は何れも T の影響をうけず、夫々 0.04、0.1、0.2% T 培地に何れも良好なる發育を示した。之に対し、NGU から分離した *Corynebacterium* 及び *Gaffkya tetragena* 並に *Corynebacterium diphtheriae* (大連株) は 0.04% で既に發育を認めず、以下 *Neisseria gonorrhoeae*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* の順に高度の發育阻止がみられた。Gram 陽性双球菌 (NGU

第Ⅲ表 Thallium acetate の PPLO 及び各種細菌の発育に及ぼす影響

菌 種	Thallium acetate 濃度			
	0	1:2,500 (0.04%)	1:1,000 (0.1%)	1:500 (0.2%)
PPLO (OT-1 ₄)	++	+	+	+
PPLO (OT-1 ₅)	+++	+++	+++	+++
PPLO (OT-1 ₆)	+++	+++	+++	++
Corynebacterium (NGU 分離株)	+++	—	—	—
Gram positive Diplococcus (//)	+++	+++	++	+
Gram positive Diplococcus (//)	+++	+++	++	+
Gaffkya tetragena (//)	+++	—	—	—
Neisseria gonorrhoeae (GU 分離株)	+++	++	—	—
Corynebacterium diphtheriae (大連株)	+++	—	—	—
Serratia marcescens (阪大微研)	+++	+++	—	—
Escherichia coli (大阪市大)	+++	+++	+	—
Escherichia coli (//)	+++	+++	+	—

+++ 多数集落 ++ 僅少集落

分離株)に対するTの影響は比較的僅少であるとはいえ、0.2%ではかなりの発育抑制がみられ、而もこの抑制された微小集落は明らかに PPLO 集落と区別することができた。

以上、7種9株の細菌を移植したT培地に於てL型集落をみたものはなかった。

B. Thallium acetate 含有選択培地の臨床実験成績。

第Ⅳ表 3培地の培養陽性率の比較

	培 養 陽 性				培養 陰性
	T +	E +	G +	PPLO	
非淋菌性 尿 道 炎 (NGU) 230	163 (71%)				28 (29%) 67 (29%)
	135 (58.8%)				
	68 (50.4%)	133 (98.5%)	133 (98.5%)	12.2% (12.2%)	
淋菌性尿 道 炎 (GU) 131	131 (100%)				0
	127 (96.9%)				
	5 (3.9%)	127 (100%)	127 (100%)	3.1% (3.1%)	
健康男子 56	53 (95%)				2 (3.5%) 3 (5.4%)
	51 (91.1%)				
	20 (39%)	51 (100%)	51 (100%)		

Thallium acetate 含有培地, PPLO 用培地及び石原淋菌用培地の3培地を同時に用いて行い得た NGU 230, 淋菌性尿道炎 (GU) 131計361例及び健康男子56例の培養成績を第Ⅳの如く表示する。

(i) 上記3培地の培養陽性率について。

NGU 少くとも3培地の何れかに培養陽性を示したのは、PPLO分離28例(12.2%)を含めて、230例中163例(71%)である。陰性は67例(29%)である。PPLO以外の菌の陽性率をみるために、培養陰性67例及びPPLO 分離28例計95例を除く135例に就き、各3培地の陽性頻度を比較するに、E及びG培地では各100%近くが培養陽性であり、T培地の夫れは50%に過ぎない。

GU : E, G 培地では全例総て淋菌発育を認め、多くは純培養、一部他細菌と混在する。然るにT培地では全く淋菌発育をみず、僅かに5例が他菌発育を示した。PPLO分離は4例(3.1%)である。

健康男子群 : 56例中培養陰性3(5.4%)及びPPLO分離2例(3.5%)を除く51例(91.1%)の、E、及びG培地の陽性頻度は、NGUの夫れに略々一致するが、T培地の陽性率は遙かに低い。

(ii) 分類菌別の比較。

上記3種の培地上に現われた集落の顕微鏡検査を実施した結果、Gram 陽性球菌, Gram 陽性桿菌, Gram

第 V 表 分離菌別の比較

	非淋菌性尿道炎 163			淋菌性尿道炎 131			健康男子 53		
	T	E	G	T	E	G	T	E	G
Gram 陽性球菌	55	85	97	3	17	11	20	42	43
Gram 陽性桿菌	9	112	120	3	14	18	1	26	25
Gram 陰性桿菌	2	6	8	0	0	0	1	4	6
Gram 不定多形性菌・淋菌	9	15	13	2	2	0			
				0	127	125			
計	75	218	238	8	158	154	22	72	74
PPLO	21	16	16	3	2	4	2	2	2

陰性桿菌, Gram 不定多形性菌, 淋菌(純培養菌により同定), PPLO に大別して第 V 表に示した。

163例の非淋菌性尿道炎例をみるに, E と G 培地に於いては明らかに, Gram 陽性球菌と桿菌の陽性度は, T 培地に比して高い。この傾向は淋菌性尿道炎と健康男子例にもみられるところである。

淋菌性尿道炎 131例についてみるに, E と G 培地に於いては, 淋菌が高率に分離されているに拘らず, T 培地に於いての淋菌の培養は皆無であるのがめだつ。

要するに Thallium acetate の添加により Gram 陽性球菌の陽性率は1/2もしくはそれ以下に抑えられ,

第 VI 表 PPLO の分離された例(44例)の培地別比較成績

	T		E		G	
	PPLO	PPLO+他菌	PPLO	PPLO+他菌	PPLO	PPLO+他菌
NGU 28/163	16	5	5	11	6	10
	21 (4)		16 (2)		16 (4)	
GU 4/131	3	0	0	2	1	3
	3		2		4 (1)	
健康男子 2/53	1	1	0	2	0	2
	2		2		2	
婦人患者 10/33	9	1	1	3	0	2
	10 (5)		4		2	
	29 (80%)	7 (20%)	6 (25%)	18 (75%)	7 (29%)	17 (71%)
	36 (9)		24 (2)		24 (5)	
	82% (20%)		55% (5%)		55% (11%)	

() : 他の培地では集落を作らなくて, 当該培地上にだけ集落を作った例数を示す

又 Gram 陽性桿菌もまた強く抑制される。その上 Thallium acetate により淋菌の増殖は完全に抑えられる。

(iii) PPLO の分離について。

上記 3 培地による PPLO の分離状況を比較するに(第 VI 表), NGU 163例に於て T 培地では21例陽性で最高である。E 及び G 培地では16例でやや劣る。しかし詳細にこれをみるに, 3 培地の何れにも陽性であつたものは7例にすぎず, 他の 2 培地では陰性であつたが T 培地でだけ陽性のもの 4 例, E 培地にだけ陽性のもの 2 例, G 培地にだけ陽性のもの 4 例であつた。

此の表で特にめだつのは婦人患者33例中 PPLO 陽性10例であること, 然もこの10例ともに T 培地に於て陽性であることである。

淋菌と PPLO との混合感染 4 例があり, 健康男子尿道より 2 例の PPLO の分離をみていることも見逃せない

又 PPLO の分離された44例中29例は, T 培地に於いて純培養の状態で分離され, T 培地を用いた場合, 44 例中36例まで陽性である事実よりみれば, Thallium acetate の PPLO 分離に際しての重要な意義がみとめられる。

III. 総括及び考按

1) PPLO 並に 7 種の純培養細菌株をもつて Thallium acetate の選択作用に関する培養試験を行い, 次の結果を得た。

PPLO 3株は何れも1/500 T 濃度にて発育阻止されない。然るに *Corynebacterium* の 2 株および *Gaffkya tetragena* は1/2, 500, *Neisseria gonorrhoeae* および *Serratia marcescens* は1/1,000, *Escherichia coli* は1/500, 夫々の T 濃度で全く発育が阻止された。Gram 陽性双球菌の 2 株 (NGU 分離) は1/500 T 濃度にてなお発育を認めたものの, それは可なり抑制的であつた。これら細菌株が移植された T 培地に L 型集落の発生を認めたものはなかつた。

Edward¹⁾ (1947) は, PPLO は1/500 T 濃度で発育阻止され, *Diphtheroid*, *Staphylococcus albus* および *aureus* は1/1,000 T 濃度で発育阻止されないと報告したが, Morton および Lecce⁴⁾ (1953) は, 1/500 T 濃度では PPLO 発育は阻止れさず, 供試細菌中 *Streptococcus*

簇のみが T によつて作用を受けない唯一の細菌であると主張した。彼等はまた T 培地では細菌の L 型発生をみないと称し、一方 Crystal violet の選択作用は培地の含有全蛋白量に左右されることを確認し、従来の Crystal violet と Potassium tellurite の混合含有培地⁶⁾は選択培地として不適當であると述べた。

私の実験成績は略々 Morton および Lecce に一致し、斯くして T 含有培地が PPLO 分離培養の為の最も優秀なる選択培地であることは、次の諸点によつて確實視される。

(i) L 型発生を認めない。

(ii) 幅広い細菌スペクトルを有ち、Gram 陽性および陰性菌の両者に対する唯一の細菌発育阻止物質である。

(iii) 培地において高圧滅菌に耐え、その選択作用は培地の含有蛋白量に左右されない

2) 男子尿道炎患者、健康男子および婦人患者から PPLO を分離する為に 0.04% T 培地を使用し、その成績を次の如く総括し PPLO 用培地 (E) および石原淋菌用培地 (G) と比較した。

(i) E, G 各培地によつて健康男子尿道から分離し得る細菌の多くは、Gram 陽性球菌および桿菌にして、その他比較的少数の Gram 陰性桿菌がみられる。これに反し、T 培地の発育菌はほとんど Gram 陽性球菌に限られ、その頻度も E 或いは G 培地の 1/2 を示すに過ぎない。NGU における成績もほとんど、傾向を同じくする。GU においては T 培地に限り淋菌の発育は皆無であつた。

(ii) 各患者群の PPLO 分離総数 44 例につき、3 培地の培養所見を比較するに、T 培地の PPLO 分離頻度は最も高く 82% を示し、E および G 培地では約 55% であつた。更に T 培地では PPLO の純培養例が 36 例中 29 例 80% の多きに達し、E 培地の 25%、G 培地の 29% に比し、格段の差異を示す。また、T 培地にのみ発育をみたのは 44 例中 9 例 20% であるのに対し、E, G 培地は夫々 4.5%、11% である。即ち、各培地を単独使用する場合、T 培地の PPLO 分離成功

率が最も高いといえる。

以上の臨床成績は正に純培養菌による実験成績に一致し、かくして PPLO の為の選択培地としての T 培地の優秀性が臨床的にも立証された。

結 論

1) PPLO 並に 7 種の細菌を用いて Thallium acetate の選択作用につき培養試験を行つた結果は次の如くである。

非淋菌性尿道炎分離 PPLO 株は 1/500 Thallium acetate 濃度にて何れも発育阻止されない。Gram 陽性双球菌はこの濃度でなお発育したが夫れはかなり抑制的である。これに反し、Corynebacterium および Gaffkya tetragena は 1/2,500, Neisseria gonorrhoeae および Serratia marcescens は 1/1,000, Escherichia coli は、1/500、夫々の Thallium acetate 濃度で完全に発育が阻止された。

これら細菌株を移植した Thallium acetate 含有選択培地に L 型集落の発生を認めなかつた。

2) 男子尿道炎患者、健康男子および婦人患者からの PPLO 分離のために、0.04% Thallium acetate 含有選択培地、慣用 PPLO 培地および石原淋菌培地の 3 者を併用して次の成績を得た。

(i) Thallium acetate 培地による分離菌はほとんど Gram 陽性球菌に限られ、分離頻度も他の 2 つの培地の半ばに過ぎない。淋菌、Gram 陽性或いは陰性桿菌の発育はほとんど完全に抑制された。

(ii) 3 培地併用による PPLO 分離総数 44 例中、Thallium acetate 培地の分離頻度は純培養 29 例 (80%) を含めて 36 例 82% であるのに対し、PPLO 培地は 24 例 55% (中純培養 6 例 25%)、石原淋菌培地は 24 例 55% (中純培養 7 例 29%) である。

御指導、御校閲を賜つた大阪大学微生物病研究所藤野恒三郎教授、並びに大阪通信病院泌尿器科山本弘部長に深謝すると共に、御援助を頂いた石原 藤太郎博士、大島升博士に感謝の意を表する。

尚本研究は日本電信電話公社医学研究費に負うところが多い、附記して謝意を表する。

文 献

- 1) Edward, D. G. : J. gen. Microbiol., **1**: 238, 1947.
- 2) Edward, D.G. : J. gen. Microbiol., **10** : 27, 1954.
- 3) Morton, H. E., Smith, P. F., Williams, N. B., and Eickenberg, C. F.: J. Dental Research, **30** 415, 1951.
- 4) Morton, H. E., and Lecce, J. G. J.

Bact., **66** 646, 1953.

- 5) Oshima, M. : Acta Urologica (Jap.), **5** : 127, 1959.
- 6) Smith, P. F., Morton, H. E., and Leberman, P. R. : Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., **74** : 552, 1950.
- 7) Yamamoto, H., Ishihara, T., Oshima, M., and Kuraoka, Y.: Acta Urologica (Jap.), **2** : 235, 1956.
- 8) Yamamoto, H. : Jap. J. Urol., **46** : 523. 1955.
- 9) White, R. W.: Brit. vet. J., **108** : 111, 1952.